



Антиметастатическая активность ингибитора матричной металлопротеиназы 2-го типа, производного фенилсульфонил-L-пролина АЛ-828, на модели карциномы лёгкого Льюис у самцов мышей линии C57BL/6

Григоркевич О. С., Коваленко Л. П., Мокров Г. В., Колик Л. Г., Гудашева Т. А., Дорофеев В. Л.

ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»,
Москва, Российская Федерация

Аннотация

Актуальность. Матричные металлопротеиназы (ММП) представляют собой группу цинк-зависимых ферментов, которые играют важную роль в регуляции физиологических и патологических процессов человека, особенно при злокачественных опухолях. Гиперэкспрессия ММП 2-го типа (ММП-2, желатиназа А) опухолевыми клетками приводит к метастазированию. Разработка селективных ингибиторов ММП в качестве средств для лечения онкологических заболеваний считается одним из перспективных направлений современной фармакологии. Ранее с использованием фармакофорного подхода сконструировано и синтезировано соединение 1-((4-[[4-хлорбензоил]амино]фенил)сульфонил)-L-пролин, получившее лабораторный шифр АЛ-828, обладающее ингибиторной активностью по отношению к ММП-2.

Цель работы. Изучение противоопухолевой и антиметастатической активности соединения АЛ-828 в сравнении с противоопухолевым препаратом первой линии гемцитабином.

Методы. Исследование проводили на экспериментальной модели эпидермоидной карциномы лёгкого Льюис (LLC) на мышах линии C57BL/6. АЛ-828 вводили внутривенно (в/в) в дозах 10 мг/кг и 30 мг/кг с 1-го по 14-й день развития опухоли. В качестве препарата сравнения использовали противоопухолевый препарат гемцитабин, который вводили в дозе 50 мг/кг, в/в, на 2-й день и 9-й день развития опухоли. Противоопухолевый эффект регистрировали на 7-, 9-, 15-й, а также на 21-й день развития опухоли, индекс ингибирования метастазирования (ИИМ) определяли на 21-й день развития опухоли. В эксперименте измеряли среднюю продолжительность жизни (СПЖ) и выживаемость. Анализ выживаемости проводили с использованием метода Каплана–Мейера.

Результаты. АЛ-828 в дозах 10 мг/кг и 30 мг/кг при курсовом введении не вызывал торможения роста опухоли (ТРО) в отличие от гемцитабина в дозе 50 мг/кг, который статистически значимо сокращал рост опухоли на всех этапах регистрации на уровне 60 %. У животных-опухоленосителей, которым вводили АЛ-828 в дозах 10 мг/кг и 30 мг/кг, ИИМ составил 48,3 и 39,2 % соответственно. У гемцитабина индекс ингибирования метастазирования был равен 75,8 %. Если в группе активного контроля до 50 % животных демонстрировали лёгкую и тяжёлую степень метастазирования в лёгких, то на фоне гемцитабина и АЛ-828 не менее 90 % животных характеризовались лёгкой степенью поражения лёгких.

Заключение. Таким образом, АЛ-828 при курсовом системном введении проявлял антиметастатическую активность на модели эпидермоидной карциномы лёгкого Льюис.

Ключевые слова: индекс ингибирования метастазирования; торможение роста опухоли; ингибитор ММП-2; АЛ-828; гемцитабин

Для цитирования:

Григоркевич О. С., Коваленко Л. П., Мокров Г. В., Колик Л. Г., Гудашева Т. А., Дорофеев В. Л. Антиметастатическая активность ингибитора матричной металлопротеиназы 2-го типа, производного фенилсульфонил-L-пролина АЛ-828, на модели карциномы лёгкого Льюис у самцов мышей линии C57BL/6. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2025;(2):9–17. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2025-2-9-17>. EDN: XGWNFS

Поступила: 20.05.2025. **В доработанном виде:** 20.06.2025. **Принята к печати:** 28.06.2025. **Опубликована:** 30.06.2025.

Antimetastatic activity of the phenylsulfonyl-L-proline derivative AL-828, a matrix metalloproteinase-2 inhibitor, in a male C57BL/6 mouse model of Lewis lung carcinoma

Oksana S. Grigorkevich, Larisa P. Kovalenko, Grigory V. Mokrov, Larisa G. Kolik, Tatiana A. Gudasheva, Vladimir L. Dorofeev
Federal Research Center for Innovators and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation

Abstract

Background. Matrix metalloproteinases (MMPs) are a group of zinc dependent enzymes that play a key role in regulating both physiological and pathological processes in humans, particularly in oncological diseases. MMP-2 (gelatinase A) overexpression promotes metastatic progression in tumor cells. The development of selective MMP inhibitors as anticancer agents represents a promising approach in modern pharmacology. Previously, the compound 1-((4-[[4-chlorobenzoyl]amino]phenyl)sulfonyl)-L-proline, which received the laboratory code AL-828, was designed and synthesized using the pharmacophoric approach, possessing inhibitory activity against MMP-2.

Objective. Antitumor and antimetastatic activity of AL-828 compared with gemcitabine as the first-line antitumor drug.

Methods. This study was conducted on an experimental model of Lewis lung carcinoma (LLC) in C57BL/6 mice. AL-828 was administered intraperitoneally (i.p.) at doses of 10 and 30 mg/kg from day 1 to day 14 of tumor development. The antitumor drug gemcitabine was administered intraperitoneally as a reference

drug at a dose of 50 mg/kg on days 2 and 9 of tumor development. The antitumor effect was assessed on days 7, 9, 15, and 21 of tumor development, and the metastasis inhibition index (MI) was measured on day 21 of tumor development. In this study, the average lifespan and survival rates were measured. Survival analysis was performed using the Kaplan–Meier method.

Results. AL-828 at doses of 10 and 30 mg/kg did not cause inhibition of tumor growth (ITG), whereas gemcitabine at a dose of 50 mg/kg significantly reduced tumor growth at all stages of registration at the level of 60 %. AL-828 at doses of 10 and 30 mg/kg, AL-828 showed antimetastatic effects, with MI values of 48.3 % and 39.2 %, respectively. Gemcitabine showed an MI of 75.8 %. Lungs from 50 % of the control group exhibited both light and high colonization potential with metastases. In contrast, the administration of either gemcitabine or AL-828 resulted in only light colonization potential in 90 % of treated animals.

Conclusion. Systemic course administration of AL-828 demonstrated antimetastatic activity in a model of LLC.

Keywords: metastasis inhibition index; tumor growth inhibition; MMP-2 inhibitor; AL-828; gemcitabine

For citations:

Grigorkevich OS, Kovalenko LP, Mokrov GV, Kolik LG, Gudashva TA, Dorofeev VL. Antimetastatic activity of the phenylsulfonyl-L-proline derivative AL-828, a matrix metalloproteinase-2 inhibitor, in a male C57BL/6 mouse model of Lewis lung carcinoma. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2025;(2):9–17. (In Russ.). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2025-2-9-17>. EDN: XGWNFS

Received: 20.05.2025. **Revision received:** 20.06.2025. **Accepted:** 28.06.2025. **Published:** 30.06.2025.

Введение / Introduction

Матриксные металлопротеиназы (ММП) представляют собой группу цинк-зависимых ферментов, которые играют важную роль в регуляции физиологических и патологических процессов в организме человека за счёт своей способности разрушать основные белковые компоненты внеклеточного матрикса, который составляет основу соединительной ткани, обеспечивает механическую поддержку клеток и транспорт химических веществ [1].

Хорошо известно, что матриксная металлопротеиназа 2-го типа (ММП-2, желатиназа А) способна принимает участие в процессе онкогенеза [2]. Так, например, у больных раком гортани была выявлена гиперэкспрессия ММП-2 опухолевыми клетками. Интенсивность экспрессии ММП-2 при этом была связана с метастазированием лимфатических узлов [3]. Продукция ММП-2 опухолевыми клетками обеспечивает их инвазивный потенциал, поэтому разработка селективных ингибиторов ММП в качестве средств для лечения онкологических заболеваний считается одним из перспективных направлений современной фармакологии.

Ранее в ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» в отделе химии с использованием фармакофорного подхода было сконструировано и синтезировано соединение 1-({4-[(4-хлорбензоил)амино]фенил}сульфонил-L-пролин, получившее шифр АЛ-828 (рис. 1), которое показало ингибиторную активность по отношению к ММП-2 ($K_i = 4,5 \times 10^{-5}$ M) [4] и обладало выраженной кардиопротективной активностью в модельных экспериментах, воспроизводящих острый инфаркт миокарда у крыс [6].

Цель данной работы — изучение противоопухолевой и антиметастатической активности соединения АЛ-828 в сравнении с противоопухолевым препаратом первой линии гемцитабином.

Материалы и методы / Materials and methods

Животные. Эксперименты выполнены на 80 мышах-самцах линии C57BL/6 массой 25–30 г на момент начала эксперимента (Филиал «Столбовая» ФГБУ науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства»). Животных содержали в стандартных условиях вивария (температура воздуха 20–22 °С, относительная влажность 30–70 %, 12-часовой цикл свет/темнота) в пластиковых клетках (полипропилен, 420x280x160 мм, ЕС) с подстилкой из опилок по 12 животных в клетке с предоставлением гранулированно-экструдированного корма (ГОСТ34566–2019) для содержания мышей, крыс и хомяков (Россия) и фильтрованной водопроводной воды *ad libitum*. Эксперименты с животными проводили в соответствии с «Руководством по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований» (Приложение к Рекомендации Коллегии Евразийской экономической комиссии от 14 ноября 2023 года № 33). Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» (Протокол № 5 от 19.04.2022 г.).

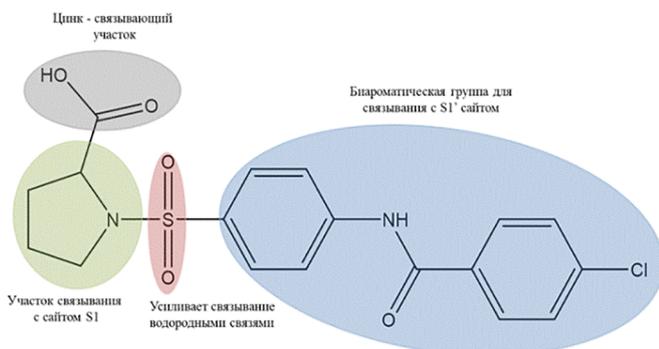


Рис. 1. Ингибитор ММП-2, 1-({4-[(4-хлорбензоил)амино]фенил}сульфонил-L-пролин, соединение АЛ-828. S1-S1' — подсайты ММП-2 [5]

Fig. 1. MMP-2 inhibitor, 1-({4-[(4-chlorobenzoyl)amino]phenyl}sulfonyl-L-proline, compound AL-828. S1-S1' — MMP-2 subsites [5]

Вещество. Соединение АЛ-828 1-((4-[(4-хлорбензоил)амино]фенил)сульфонил-L-пролин синтезировано в отделе химии лекарственных средств ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» как описано ранее [5]. Хроматографическая чистота по данным ОФ ВЭЖХ при λ 220 нм равна 90 % $\tau = 19,20$ мин (1 мг/мл на колонке Диасфер-С16, 5 мкм («BioChemMack», Россия); подвижная фаза А (0,5 мл раствор ТФУ в 50 мл ацетонитрила и 950 мл воды), подвижная фаза Б (0,5 мл раствор ТФУ в ацетонитриле). Градиент: от 0 до 100 % Б (0–30 мин), 100 % Б (30–35 мин), от 100 до 0 % Б (35–36 мин), 0 % Б (36–40 мин); 0,9 мл/мин); $[\alpha]_{220D} = -84^\circ$ при $c = 0,1$ % (m/v) в МеОН. Т.пл. = 215–217 °С.

Спектр ¹H-ЯМР (DMSO-d₆, δ , м.д.): 1.56, 1.85 (уш. м, 4 Н, ProC β H₂, , ProC γ H 2); 3.16, 3.36 (два м, 2 Н, ProC δ H₂); 4.10 (дд, 1 Н, ProC α H, 3J = 7.8 Гц; 3J = 4.4 Гц); 7.64 (д, 2 Н, С3'Н, С5'Н, 3J = 8.8 Гц); 7.83 (д, 2 Н, С3Н, С5Н, 3J = 8.8 Гц); 8.00 (д, 2 Н, С2'Н, С6'Н, 3J = 8.8 Гц); 8.02 (д, 2 Н, С2Н, С6Н, 3J = 8.8 Гц); 10.69 (с, 1 Н, NH). Н-ESI [M+H]⁺ – 409,17; 411,03 м/z.

В качестве препарата сравнения использовали гемцитабин в форме лиофилизата («Биокад», Россия).

Противоопухолевая активность на модели эпидермоидной карциномы лёгкого Льюис (англ. Lewis Lung Carcinoma; LLC). Исследование противоопухолевой и антиметастатической активности АЛ-828 проведено на экспериментальной модели эпидермоидной карциномы лёгкого Льюис, полученной из банка клеточных культур НИИ Экспериментальной диагностики и терапии опухолей научного медицинского исследовательского центра онкологии имени Н.Н. Блохина. Взвесь опухолевых клеток LLC (50 мг в 0,5 мл раствора Хэнкса на мышь) перевивали 80 самцам мышей линии С57BL/6 подкожно в область подмышечной впадины. Максимальная прививочная доза составляла не менее 5×10^6 клеток/мышь. День подкожной прививки клеток опухолевого штамма считался нулевым днём развития опухоли. В настоящей работе в качестве позитивного контроля был выбран гемцитабин (2' дезокси 2',2' дифторцитидин гидрохлорид), который вошёл в первую линию противоопухолевой терапии и успешно применяется в клинической практике при лечении многих видов злокачественных новообразований, в частности немелкоклеточного рака лёгких [7]. Лиофилизат гемцитабина растворяли в изотоническом растворе натрия хлорида (ООО «Мосфарм», Россия) и вводили внутривенно (в/б) в дозе 50 мг/кг на 2-й день и 9-й день развития опухоли. Суммарная доза в 100 мг/кг гемцитабина является субтерапевтической, её выбрали с целью лимитирования токсического действия. Животным опытных 3-й и 4-й групп вводили АЛ-828 с 1-го по 14-й день развития опухоли в дозах 10 мг/кг и 30 мг/кг, выбранных на основе пилотных исследований фармакологической активности ингибиторов ММП-2, который разводили в 1 % водном

крахмале (по ОФС.1.3.0001 ГФ РФ 15 издания «Реактивы. Индикаторы»). В экспериментальных группах было по 10 животных:

1) группа активного контроля с LLC: животные, не получавшие лекарственную терапию; животным с LLC 14 дней в/б вводили 1 % водный крахмал;

2) группа животных, которым вводили в/б гемцитабин двукратно на 2-й и 9-й дни развития опухоли (суммарная доза 100 мг/кг);

3) группа животных с LLC, которым вводили в/б в течение 14 дней АЛ-828 в дозе 10 мг/кг (суммарная доза 140 мг/кг);

4) группа животных с LLC, которым вводили в/б в течение 14 дней АЛ-828 в дозе 30 мг/кг (суммарная доза 420 мг/кг).

Были изучены следующие параметры: ингибирование роста опухоли по объёму, средняя продолжительность жизни (СПЖ), индекс ингибирования метастазирования (ИИМ) по сравнению с активным контролем. Противоопухолевый эффект регистрировали на 7-, 9-, 15-й, а также на 21-й день развития опухоли (7-й день после окончания 2 недельного введения АЛ-828). Расчёт объёма опухоли проводили после измерения трёх её размеров по формуле: $V = A \times B \times C$ на 7-, 9-, 15-й, а также на 21-й день развития LLC. Измерение объёма опухоли проводили инженерным микрометром.

Торможение роста опухоли (ТРО, %) вычисляли по формуле:

$$\text{ТРО \%} = [(V_{\text{контроля}} - V_{\text{опыта}}) / V_{\text{контроля}}] \times 100 \%,$$

где $V_{\text{контроля}}$ — средний объём опухолей в группе активного контроля, (мм³);

$V_{\text{опыта}}$ — средний объём опухолей в опытной группе, (мм³).

Согласно методическим рекомендациям, критерии противоопухолевой активности препарата должны учитываться через 7 дней после окончания его введения и ТРО должно быть не менее 70 % [8].

Метастазы в 5 лопастях правого и одной доли левого лёгкого мышей выявляли под лупой с 8-кратным увеличением (Magnifer Lamp 8608 E-D XB с кольцевой люминесцентной подсветкой). При оценке интенсивности метастазирования использовали следующие показатели: частоту метастазирования LLC вычисляли в процентах (по отношению числа животных с метастазами к общему числу животных в группе); подсчитывали среднее количество метастазов у одного животного в группе; величину различия метастазирования опухоли между активным контролем и опытными группами оценивали по индексу ингибирования метастазирования. Индекс ингибирования метастазирования (ИИМ) определялся по формуле:

$$\text{ИИМ} = (A_k \times B_k) - (A \times B) / (A_k \times B_k) \times 100 \%,$$

где A_k и A — частота метастазирования в лёгких у мышей контрольной группы и опытной;

Вк и В — среднее число метастазов в лёгких в контрольной и опытной группах.

Степень метастатического поражения лёгких в зависимости от количества и размера метастазов, согласно методическим рекомендациям [9], оценивали по следующим критериям: к лёгкой степени метастатического поражения относится (ЛСП): 0) отсутствие у ряда животных-опухоленосителей метастазов в лёгких; 1) количество метастазов меньше 10 с диаметров не больше 1 мм; 2) количество метастазов от 10 до 30 с диаметром 1 мм.

К высокой степени метастатического поражения относится (ВСП): 3) количество больше 30 метастазов различных размеров, однако отсутствуют сливные; 4) тяжёлое поражение лёгочной ткани, менее 100 штук, однако отсутствуют сливные метастазы; 5) массивное поражение лёгких, более 100 метастазов, наличие сплошных опухолевых узлов.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного обеспечения STATISTICA 12. Проверка на нормальность распределения была определена с применением критерия Шапиро—Уилка. Все регистрируемые характеристики животных представлены в таблицах в виде среднего и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$). Для проверки гипотезы об однородности групп исследования с нормальным распределением в исследуемой популяции проводили тестирование отсутствия различий между группами при помощи t-критерия Стьюдента. В случае распределения, отличающегося от нормального, для сравнения показателей использовались непараметрический критерий Манна—Уитни. Оценку гомогенности дисперсий проводили по тесту Левена. Значимость влияния факторов при гомогенной дисперсии определялась с помощью дисперсионного анализа ANOVA, с последующей обработкой методом множественных сравнений по Тьюки. Анализ выживаемости проводился с использованием метода Каплана—Мейера, для оценки достоверности различий между кривыми выживаемости использовался F-критерий Кокса. Результаты считались статистически достоверными при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Согласно данным, представленным в табл. 1, противоопухолевый препарат гемцитабин приводил к значимому торможению роста опухоли на всех сроках регистрации. Например, на 7-, 9, 15-й и 21-й день после начала введения препарата ТРО составило 60 %. Соединение АЛ-828 при курсовом введении не приводило к статистически значимому торможению роста опухоли (ТРО) ни на одном сроке наблюдения. Увеличение дозы АЛ-828 до 30 мг/кг не приводило к усилению ТРО.

В табл. 2 представлены данные оценки антиметастатической активности АЛ-828. У препарата сравне-

ния гемцитабина ИИМ составил 75,8 %. У животных-опухоленосителей, которым вводили АЛ-828 в дозе 10 мг/кг, ИИМ составил 48,3 %, а в дозе 30 мг/кг — 39,2 %. Таким образом, соединение АЛ-828 в использованном диапазоне доз проявило статистически значимую антиметастатическую активность, уступающую однако по выраженности эффекта гемцитабину.

В табл. 3 представлены данные, характеризующие степень поражения лёгких в зависимости от количества и размера метастазов. В активном контроле животных с LLC наблюдали до 50 % животных с лёгкой и тяжёлой степенью метастазирования в лёгких. На фоне использования гемцитабина или соединения АЛ-828 в дозах 10 мг/кг и 30 мг/кг не менее 90 % животных характеризовались лёгкой степенью поражения лёгких.

Согласно данным, представленным в табл. 4 и на рис. 2, в эксперименте не выявлено значимых изменений увеличения средней продолжительности жизни (УПЖ). УПЖ у животных, получавших гемцитабин в суммарной дозе 100 мг/кг составило 47 %. При курсовом введении соединения АЛ-828 в дозе 10 мг/кг УПЖ составило 0 %, при введении АЛ-828 в дозе 30 мг/кг — 28,2 %.

Медиана выживаемости по методу Каплан—Мейера (рис. 2) у животных активного контроля составила 14 дней, при введении гемцитабина в суммарной дозе 100 мг/кг — 14 дней. При курсовом введении АЛ-828 в дозе 10 мг/кг медиана выживаемости составила 14 дней, а при введении АЛ-828 в дозе 30 мг/кг — 9 дней.

Таким образом, курсовое введение АЛ-828 в дозах 10 мг/кг и 30 мг/кг и гемцитабина в суммарной дозе 100 мг/кг не вызывает значимого увеличения средней продолжительности жизни и медианы выживаемости животных-опухоленосителей опытных групп по сравнению с активным контролем.

Согласно экспериментальным исследованиям, ММП участвуют в возникновении и развитии солидных опухолей, в основном за счёт дегградации внеклеточного матрикса, регуляции полиморфизма генов, стимулирования эпителиально-мезенхимальной трансформации и индукции экспрессии молекул адгезии. При солидных опухолях ММП способствуют инвазии и метастазированию опухолевых клеток, однако функция ММП заключается не только в разрушении внеклеточного барьера, но и в стимулировании миграции опухолевых клеток, воздействуя на многочисленные сигнальные пути, такие как пролиферация клеток, инвазия сосудов и апоптоз [1].

Экспериментальные исследования *in vivo* и *in vitro* показали, что ММП-1, -2, -7, -8, -9, -12 и -26 участвуют в патогенезе рака лёгких [10]. Ингибиторы матриксных металлопротеиназ активно изучаются в качестве возможных средств для лечения солидных опухолей. Поскольку ММП являются цинк-зависимыми протеазами, конструкция ингибиторов ММП в основном основана на их связывании с ионом цинка в активном центре ферментов [1, 2]. Однако первые ингибиторы ММП (например, батимастат и маримастат) не прошли

Таблица 1

Влияние АЛ-828 и гемцитабина на рост LLC у мышей-опухоленосителей C57BL/6

Table 1

Effect of AL-828 and gemcitabine on tumor growth in C57BL/6 mice with LLC

Группы	Изменение объёма опухоли LLC							
	7-е сутки развития		9-е сутки развития		15-е сутки развития		21-е сутки развития	
	VLLC мм ³	ТРО [^] %	VLLC мм ³	ТРО [^] %	VLLC мм ³	ТРО [^] %	VLLC мм ³	ТРО [^] %
Контроль, LLC	288,6±43,3	–	565,6±37,8	–	2208,7±478,9	–	3649,5±588,4	–
Гемцитабин, 50 мг/кг, в/б	110,6±14,6*	61,7	268,9±32,2*	52,5	867,3±212,7*	60,7	1457,6±240*	60,0
АЛ-828, 10 мг/кг, в/б	279,6±34,3	3,1	428,3±65,4	24,3	931,9±205,0	57,8	2535,3±433,1	30,5
АЛ-828, 30 мг/кг, в/б	239,7±45,2	16,9	352,8±58,3	37,6	1629,6±296,5	26,2	3423,1±547,5	6,2

Примечания: * – $p < 0,05$ по критерию Тьюки; ^ – ТРО – торможение роста опухоли; Расчёт объёма опухоли проводили после измерения 3 её размеров по формуле: $V = A \times B \times C$; ТРО вычисляли по формуле $TPO \% = (V_{\text{контроля}} - V_{\text{опыта}}) / V_{\text{контроля}} \times 100 \%$; количество животных в каждой группе – 10.
Notes: * – $p < 0,05$ statistically significant difference in comparison to control group, Tukey's test; ^ – TPO – the inhibition of tumor growth; The tumor volume was calculated after measuring its 3 sizes using the formula: $V = A \times B \times C$; TPO was calculated using the formula $TPO \% = (V_{\text{control}} - V_{\text{experiment}}) / V_{\text{control}} \times 100 \%$; the number of animals in each group is 10.

Таблица 2

Влияние АЛ-828 и гемцитабина на развитие процессов метастазирования у мышей C57BL/6 с LLC

Table 2

Effect of AL-828 and gemcitabine on metastasis in experiment in C57BL/6 mice with LLC

Группы	Параметры метастазирования на 21 сутки развития LLC		
	Количество животных с метастазами	Количество метастазов на 1 мышь (M±m)	ИИМ, % [^]
Контроль	100	32,5±2,9	–
Гемцитабин 50 мг/кг, в/б	90	9,0±1,5*	75,8
АЛ-828, 10 мг/кг, в/б	100	16,8±1,3*	48,3
АЛ-828, 30 мг/кг, в/б	100	19,8±1,0*	39,2

Примечания: * – $p < 0,05$ по критерию Тьюки; ^ – ИИМ – индекс ингибирования метастазирования, рассчитывали по формуле: $ИИМ = (A_k \times B_k) - (A \times B) / (A_k \times B_k) \times 100 \%$, где A_k и A – частота метастазирования в лёгких у мышей контрольной группы и опытной; B_k и B – среднее число метастазов в лёгких в контрольной и опытной группах; количество животных в каждой группе – 10.
Notes: * – $p < 0,05$ statistically significant difference in comparison to control group, Tukey's test; n – number of animals in groups; ^ – ИИМ – metastasis inhibition index, calculated using the formula: $ИИМ = (A_k \times B_k) - (A \times B) / (A_k \times B_k) \times 100\%$, where A_k и A – the frequency of metastasis in the lungs in mice of the control and experimental groups; B_k и B – average number of metastases in the lungs in the control and experimental groups; the number of animals in each group is 10.

Таблица 3

Влияние АЛ-828 и гемцитабина на тяжесть метастатического поражения мышей C57BL/6 с LLC

Table 3

Effect of AL-828 and gemcitabine on metastatic burden severity in C57BL/6 mice with LLC

Группы	Степень поражения лёгких метастазами (%)					
	Нет метастазов	ЛСП [^]		ВПС ^{^^}		
		1	2	3	4	5
Контроль	–	–	50	40	10	–
Гемцитабин 50 мг/кг, в/б	10	40	50	–	–	–
	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	–	–	–
АЛ-828 10 мг/кг, в/б	–	20	70	10	–	–
	–	$p < 0,05$		$p < 0,05$		
АЛ-828 30 мг/кг, в/б	–	–	100	–	–	–
	–	$p < 0,05$		$p < 0,05$		

Примечания: $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой по тесту Манна–Уитни; ^ – ЛСП – лёгкая степень метастатического поражения; ^^ – ВСП – высокая степень метастатического поражения; количество животных в каждой группе – 10.
Notes: n – number of animals in groups; $p < 0,01$ statistically significant difference in comparison to control group, Mann–Whitney test; ^ – ЛСП – low colonization potential; ^^ – ВСП – high colonization potential; the number of animals in each group is 10.

Таблица 4

Средняя продолжительность жизни после введения АЛ-828 и гемцитабина у мышей C57BL/6 с LLC

Table 4

Average lifespan of C57BL/6 mice with LLC after AL-828 and gemcitabine administration

Группы	СПЖ [^] , дни	УПЖ, %
Контроль LLC	11,7±3,7	–
LLC + гемцитабин 50 мг/кг, в/б	17,2±9,2	47
LLC + АЛ-828 10 мг/кг, в/б	11,6±5,7	0
LLC + АЛ-828 30 мг/кг, в/б	15,0±3,4	28,2

Примечания: [^] — СПЖ — средняя продолжительность жизни; УПЖ — увеличение средней продолжительности жизни, рассчитывали по формуле: УПЖ = (СПЖопыта – СПЖконтроля) / СПЖконтроля × 100 %; количество животных в каждой группе — 10.
Notes: [^] — СПЖ — average lifespan. УПЖ — increase in average lifespan, calculated using the formula: УПЖ = (СПЖexperiment – СПЖcontrol) / СПЖexperiment × 100 %; the number of animals in each group is 10.

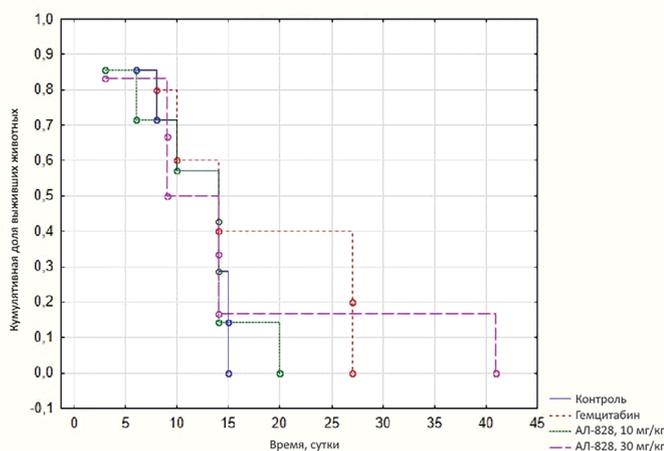


Рис. 2. Влияние АЛ-828 и гемцитабина на продолжительность жизни у мышей C57BL/6 с LLC (метод Каплан–Мейера)

Fig. 2. Effect of AL-828 and gemcitabine on survival rate of C57BL/6 mice with LLC (Kaplan–Meier method)

клинические испытания из-за низкой биодоступности при пероральном введении и серьёзных побочных эффектов [1, 2].

В данной работе было проведено исследование по выявлению противоопухолевой и антиметастатической активности ингибитора ММП-2, 1-({4-[(4-хлорбензоил)амино]фенил}сульфонил-L-пролин, соединения АЛ-828, которое ранее проявило кардиопротективную активность в дозе 30 мг/кг [11]. По данным литературы, диапазон доз для изучения противоопухолевой и антиметастатической активностей ингибиторов ММП варьируется от 10 мг/кг до 120 мг/кг [12–14], поэтому для пилотных исследований АЛ-828 были отобраны дозы 10 мг/кг и 30 мг/кг для курсового введения.

В настоящее время в доклинических исследованиях наиболее оправданным и целесообразным признано

использование перевиваемых опухолей, поскольку они отличаются относительным постоянством строения и биологических свойств, а также позволяют проводить скрининговые исследования. Моделированию злокачественного процесса в опытах *in vivo* даёт возможность получить наиболее полную информацию о новом соединении с предполагаемой противоопухолевой активностью, регистрировать динамику роста первичной опухоли и процесс метастазирования [15]. Фармакологическую оценку эффективности нового ингибитора ММП-2 осуществляли на эпидермоидной карциноме лёгкого Льюис, характеризующейся интенсивным метастазированием [16, 17]. При подкожной прививке мышам максимального количества опухолевых клеток (5×10^6 клеток/мышь) эпидермоидной карциномы лёгкого Льюис (LLC, 3LL) на 7-й день после окончания введения АЛ-828 в дозах 10 и 30 мг/кг, а также гемцитабина в суммарной дозе 100 мг/кг не достигнуто эффективного торможения роста опухоли, которое, согласно методическим рекомендациям, должно быть не менее 70 %, через 7 дней после окончания введения препаратов [9].

Полученные данные согласуются с ранее опубликованными результатами исследований противоопухолевой активности ингибиторов ММП-2. Так, например, батимастат вызывал торможение роста опухоли на модели LLC всего лишь на 25 % [14].

При изучении антиметастатических свойств, согласно «Методическим указаниям по доклиническому изучению средств, обладающих способностью ингибировать процесс метастазирования и повышать эффективность цитостатической терапии злокачественных опухолей» [9] соединения, обладающие антиметастатической активностью, должны эффективно ингибировать процесс спонтанного метастазирования перевиваемых опухолей при подкожной или внутримышечной их прививке в присутствии первичного опухолевого узла на 35–75 %. Индекс ингибирования метастазирования (ИИМ) на 7-й день после окончания введения соединения АЛ-828 в дозе 10 и 30 мг/кг составил 48 и 39 % соответственно. При двукратном введении гемцитабина в дозе 50 мг/кг определено выраженное подавление метастазирования: на 7-й день после окончания введения ИИМ составил 76 %. Анализ данных по антиметастатической активности ингибиторов ММП-2 свидетельствует об эффективном подавлении метастазирования при моделировании карциномы лёгких [14, 18, 19], что согласуется с полученными данными.

Заключение / Conclusion

Таким образом в опытах *in vivo* впервые установлены антиметастатические свойства ингибитора ММП-2, что указывает на целесообразность дальнейшего изучения его фармакологической активности в более широком диапазоне доз с использованием других экспериментальных моделей.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Конфликт интересов

Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

Участие авторов

Григоркевич О. С. — синтез соединения АЛ-828, выполнение экспериментальной работы, анализ и интерпретация результатов, написание текста; *Коваленко Л. П.* — дизайн эксперимента, выполнение экспериментальной работы, анализ и интерпретация результатов; *Мокров Г. В.*, *Коллик Л. Г.* — обсуждение результатов, редактирование текста; *Гудашева Т. А.* — постановка задачи, координация работы исследователей, редактирование текста; *Дорофеев В. Л.* — обсуждение результатов, редактирование текста.

Соблюдение этических норм

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов.

ADDITIONAL INFORMATION

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Authors' participation

Grigorkevich OS — synthesis of the compound AL-828, execution of experimental work, analysis and interpretation of results, manuscript writing; *Kovalenko LP* — experimental design, execution of experimental work, analysis and interpretation of results; *Mokrov GV*, *Kolik LG* — discussion of results, manuscript editing; *Gudasheva TA* — task formulation, coordination of researchers' work, manuscript editing; *Dorofeev VL* — discussion of results, manuscript editing.

Compliance with ethical standards

This article does not describe any studies involving human subjects.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Григоркевич Оксана Сергеевна — н. с. лаборатории тонкого органического синтеза отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация

Автор, ответственный за переписку

e-mail: grigorkevich_os@academpharm.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7702-0569>

РИНЦ SPIN-код: 9149-3541

Oksana S. Grigorkevich — Research Scientist of the Fine Organic Synthesis Laboratory of the Medicinal Chemistry Department Federal Research Center for Innovators and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation

Corresponding author

e-mail: grigorkevich_os@academpharm.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7702-0569>

RSCI SPIN code: 9149-3541

Коваленко Лариса Петровна — д. б. н., в. н. с. группы иммунофармакологии лаборатории лекарственной токсикологии отдела лекарственной токсикологии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация
e-mail: kovalenko_lp@academpharm.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2083-0832>

РИНЦ SPIN-код: 5185-4250

Larisa P. Kovalenko — PhD, Dr. Sci. (Biology), Leading Research Scientist of Group of Immunopharmacology Laboratory Drug Toxicology Department of Drug Toxicology Federal Research Center for Innovators and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation

e-mail: kovalenko_lp@academpharm.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2083-0832>

RSCI SPIN code: 5185-4250

Мокров Григорий Владимирович — к. х. н., руководитель лаборатории тонкого органического синтеза отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация
e-mail: mokrov_gv@academpharm.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2617-0334>
РИНЦ SPIN-код: 8755-7666

Grigory V. Mokrov — PhD, Cand. Sci. (Chemical), Head of the Fine Organic Synthesis Laboratory at the Drug Chemistry Department Federal Research Center for Innovators and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation
e-mail: mokrov_gv@academpharm.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2617-0334>
RSCI SPIN code: 8755-7666

Колик Лариса Геннадьевна — д. б. н., профессор РАН, руководитель лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация
e-mail: kolik_lg@academpharm.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9847-8058>
РИНЦ SPIN-код: 9126-6922

Larisa G. Kolik — PhD, Dr. Sci. (Biology), Professor RAS, Head of laboratory of medicinal toxicology Federal Research Center for Innovators and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation
e-mail: kolik_lg@academpharm.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9847-8058>
RSCI SPIN code: 9126-6922

Гудашева Татьяна Александровна — д. б. н., профессор, член-корреспондент РАН, руководитель отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация
e-mail: gudasheva_ta@academpharm.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5185-4474>
РИНЦ SPIN-код: 4970-0006

Tatiana A. Gudasheva — PhD, Dr. Sci. (Biology), Professor, RAS corresponding member, Head of medicinal chemistry department Federal Research Center for Innovators and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation
e-mail: gudasheva_ta@academpharm.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5185-4474>
RSCI SPIN code: 4970-0006

Дорофеев Владимир Львович — д. фарм. н., профессор, и. о. генерального директора ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация
e-mail: dorofeev_vl@academpharm.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0004-3584-3742>

Vladimir L. Dorofeev — PhD, Dr. Sci. (Pharm), Professor, Acting General Director of Federal Research Center for Innovators and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation
e-mail: dorofeev_vl@academpharm.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0004-3584-3742>

Список литературы / References

1. Cabral-Pacheco GA, Garza-Vélez I, Castruita-De la Rosa C, et al. The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *Int J Mol Sci*. 2020 Dec 20;21(24):9739. doi: 10.3390/ijms21249739.
2. Dufour A, Overall CM. Missing the target: matrix metalloproteinase antitargets in inflammation and cancer. *Trends Pharmacol Sci*. 2013 Apr;34(4):233-42. doi: 10.1016/j.tips.2013.02.004.
3. Song Z, Wang J, Su Q, et al. The role of MMP-2 and MMP-9 in the metastasis and development of hypopharyngeal carcinoma. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2021 Sep-Oct;87(5):521-528. doi: 10.1016/j.bjorl.2019.10.009.
4. Григорьевич О.С., Мокров Г.В., Золотов Н.Н., и др. Поиск селективных ингибиторов матричной металлопротеиназы 2-го типа в ряду производных бензоиламино(фенилсульфонил)-замещенных циклических аминокислот. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2020;23(11):22-27. [Grigorjevich OS, Mokrov GV,

Zolotov NN, et al. Searching for selective inhibitors of matrix metalloproteinase type 2 in a series of benzoilamino (phenylsulfonyl)-substituted cyclic amino acid derivatives. *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry*. 2020;23(11):22-27. (In Russ.]. doi: 10.29296/25877313-2020-11-04.

5. Григорьевич О.С., Мокров Г.В., Дябина А.С. и др. Дизайн, синтез и фармакологическая активность нового ингибитора матричной металлопротеиназы-9. *Химико-фармацевтический журнал*. 2018;52(1):8-14. [Grigorjevich OS, Mokrov GV, Dyabina AS, et al. Design, synthesis and pharmacological activity of a new inhibitor of matrix metalloproteinase-9. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*. 2018;52(1):8-14. (In Russ.).]

6. Мирошкина И.А., Григорьевич О.С., Цорин И.Б., и др. К механизму действия селективного ингибитора матричной металлопротеиназы 2 типа 1-(4-[(4-хлорбензоил)амино]фенил)сульфонил-L-пролина. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2023;86(11S):107a. [Miroshkina IA, Grigorjevich OS, Tsorin IB, et al. On the action mechanism of the selective matrix metalloproteinase type 2

- inhibitor, 1-((4-[(4-chlorobenzoyl)amino]phenyl)sulfonyl-L-proline. *Éksperimental'naya i Klinicheskaya Farmakologiya*. 2023;86(11S):107a. (In Russ.). doi: 10.30906/ekf-2023-86s-107a.
7. Гуторов С.Л., Семенов Н.Н., Личиницер М.Р. Роль гемцитабина (гемзара) в терапии неоперабельного немелкоклеточного рака легкого. *Вестник РОНЦ им Н.Н. Блохина РАМН*. 1999;10(2):37-41. [Gutorov SL, Semenov NN, Lichinitser MR. Gemcytabine (gemsar) in therapy for inoperable non-small cell lung cancer. *Journal of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS*. 1999;10(2):37-41. (In Russ.)].
8. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К., и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К; 2012. С. 642-656. [Treschalina EM, Zhukova OS, Gerasimova GK, et al. Methodical recommendations for the pre-clinical study of the antitumor activity of drugs. In the book: Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part one. / ed by AN Mironov. Moscow: Grif i K; 2012. P. 642-656. (In Russ.)].
9. Зуева Е.П., Козлов А.М., Герасимова Г.К. и др. Методические указания по доклиническому изучению средств, обладающих способностью ингибировать процесс метастазирования и повышать эффективность цитостатической терапии злокачественных опухолей. Руководство по экспериментальному доклиническому изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р.У. Хабриева. М.: Медицина; 2005. С. 637-651. [Zueva EP, Kozlov AM, Gerasimova GK. Metodicheskie ukazaniya po doklonicheskomu izucheniyu sredstv, obladayushih sposobnostyu ingibirovat process metastazirovaniya i povishat effektivnost citostaticheskoy terapii zlokachestvennih opuholey. Rukovodstvo po eksperimentalnomu doklonicheskomu izucheniyu novih farmakologicheskikh veshchestv / ed by RU Khabriev. M.: Medicina; 2005. P. 637-651. (In Russ.)].
10. Li M, Yan T, Cai Y, et al. Expression of matrix metalloproteinases and their association with clinical characteristics of solid tumors. *Gene*. 2023 Jan 20;850:146927. doi: 10.1016/j.gene.2022.146927.
11. Крыжановский С.А., Ионова Е.О., Столярук В.Н., и др. Изучение кардиопротективных эффектов ингибитора металлопротеиназы 1-((4-[(4-хлорбензоил)амино]фенил)сульфонил-L-пролина на модели острого инфаркта миокарда. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2019;168(11):582-587. [Kryzhanovsky SA, Ionova EO, Stolyaruk VN, et al. Cardioprotective Effects of Metalloproteinase Inhibitor 1-((4-[(4-Chlorobenzoyl)amino]phenyl)sulfonyl-L-Proline in Modeled Acute Myocardial Infarction. *Byulleten' Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny*. 2019;168(11):582-587. (In Russ.)]. doi: 10.1007/s10517-020-04770-4.
12. Devy L, Huang L, Naa L, et al. Selective inhibition of matrix metalloproteinase-14 blocks tumor growth, invasion, and angiogenesis. *Cancer Res*. 2009 Feb 15;69(4):1517-26. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3255
13. Winer A, Janosky M, Harrison B, et al. Inhibition of Breast Cancer Metastasis by Presurgical Treatment with an Oral Matrix Metalloproteinase Inhibitor: A Preclinical Proof-of-Principle Study. *Mol Cancer Ther*. 2016 Oct;15(10):2370-2377. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0194.
14. Prontera C, Mariani B, Rossi C, et al. Inhibition of gelatinase A (MMP-2) by batimastat and captopril reduces tumor growth and lung metastases in mice bearing Lewis lung carcinoma. *Int J Cancer*. 1999 May 31;81(5):761-6. doi: 10.1002/(sici)1097-0215(19990531)81:5<761::aid-ijc16>3.0.co;2-1.
15. Додохова М.А., Акименко М.А., Воронова О.В., и др. Сравнительный анализ использования моделей меланомы В16 и эпидермоидной карциномы легкого Льюис для проведения доклинических исследований соединений с предполагаемым противоопухолевым действием. *Уральский медицинский журнал*. 2023;22(5):66-76. [Dodokhova MA, Akimenko MA, Voronova OV, et al. Comparative analysis of the use of B16 melanoma and epidermoid Lewis lung carcinoma models for preclinical studies of compounds with a putative antitumor effect. *Ural Medical Journal*. 2023;22(5):66-76. (In Russ.)]. doi: 10.52420/2071-5943-2023-22-5-66-76.
16. Ophir R, Pecht M, Keisari Y, et al. Thymic humoral factor-gamma 2 (THF-gamma 2) immunotherapy reduces the metastatic load and restores immunocompetence in 3LL tumor-bearing mice receiving anticancer chemotherapy. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 1996 May;18(2):209-36. doi: 10.3109/08923979609052733.
17. Коваленко Л.П., Коржова К.В., Никитин С.В., и др. Коррекция уровня сывороточных проонкогенных цитокинов и метастазирования производными 5-оксипиримидина и доxorубицином после удаления первичного опухолевого узла у мышей с метастазирующим раком лёгкого LLC. *Биомедицинская химия*. 2023;69(1):39-45. [Kovalenko LP, Korzhova KV, Nikitin SV, et al. Correction of serum prooncogenic cytokines and metastases by 5-hydroxypyrimidine derivatives and doxorubicin after removal of a primary tumor node in mice with the Lewis lung epidermoid carcinoma. *Biomed Khim*. 2023;69(1):39-45. (In Russ.)]. doi: 10.18097/PBMC20236901039.
18. Lee SJ, Sakurai H, Oshima K, et al. Anti-metastatic and anti-angiogenic activities of a new matrix metalloproteinase inhibitor, TN-6b. *Eur J Cancer*. 2003 Jul;39(11):1632-41. doi: 10.1016/s0959-8049(03)00375-7.
19. Fujino H, Kondo K, Ishikura H, et al. Matrix metalloproteinase inhibitor MMI-166 inhibits lymphogenous metastasis in an orthotopically implanted model of lung cancer. *Mol Cancer Ther*. 2005 Sep;4(9):1409-16. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0031.